

TRABAJO FIN DE GRADO

Ensayos batch de lodos y residuos agroalimentarios para la optimización de la tecnología de separación de fases de microorganismos del proceso anaerobio.



Autora: María Montes Carrillo

Tutoras: Monserrat Pérez García y Rosario Solera del Río

Puerto Real, junio 2021

Índice

1. Introducción	7
2. Antecedentes bibliográficos	7
2.1. Descripción y problemática de los sustratos	7
2.1.1. Lodos de EDAR	7
2.1.2. Vinazas de vino	8
2.1.3. Gallinazas	8
2.2. Digestión anaerobia	9
2.2.1. Parámetros de operación.....	10
2.2.2. Tipos de digestión anaerobia	11
2.2.3. Test de biodegradabilidad anaerobia	13
3. Objetivos	14
4. Materiales y métodos	14
4.1. Plan de trabajo	15
4.2. Caracterización	15
4.2.1. Residuos e inóculo.....	15
4.2.2. Sustratos mezcla	16
4.3. Test de Biodegradabilidad BHP y BMP	16
4.3.1. Montaje y operación de los ensayos BHP	17
4.3.2. Montaje y operación de los test BMP.....	17
4.4. Rendimiento de los procesos	18
4.5. Equipos y técnicas analíticas	18
4.5.1. Demanda Química de Oxígeno.....	19
4.5.2. Sólidos Totales y Sólidos Volátiles	20
4.5.3. pH	20
4.5.4. Ácidos Grasos Volátiles	20

4.5.5.	Determinación de patógenos	21
4.6.	Medidas biogás	21
4.6.1.	Presión	22
4.6.2.	Composición.....	22
5.	Resultados y discusión	22
5.1.	Caracterización inicial	22
5.1.1.	Residuos e inóculo.....	22
5.1.2.	Caracterización de las mezclas de sustratos	24
5.2.	Análisis de los test de biodegradabilidad.....	25
5.2.1.	Resultado de los test BHP	25
5.2.2.	Resultados de los test BMP	27
5.2.3.	Rendimiento de los procesos	28
5.3.	Determinación de patógenos.....	29
5.4.	Biogás	29
5.4.1.	Hidrógeno	29
5.4.2.	Metano.....	31
6.	Conclusiones	32
7.	Bibliografía.....	33
	Anexo I – Alternativas de la DA	36
	Anexo II – Plan de trabajo.....	37
	Anexo III – Equipos	38
	Anexo IV - Acrónimos	39

Resumen

Este Trabajo de Fin de Grado se enmarca dentro del proyecto de investigación P18-RT-1348 (Convocatoria Retos de la Junta de Andalucía), del Grupo de investigación Tecnología del Medio Ambiente (TEP-181). El objetivo del trabajo es el estudio de la co-digestión anaerobia en fases separadas, ambas en rango mesofílico, de lodos y residuos agroalimentarios (vinazas y gallinaza). Se realizan ensayos batch de biodegradabilidad para las diferentes etapas microbiológicas del proceso que se llevan a cabo de forma secuencial. En la primera etapa se genera hidrógeno (BHP) y en la segunda metano (BMP), en función de las condiciones de pH y temperatura óptimas de cada proceso.

Según los resultados obtenidos se ha comprobado que el BHP en temperatura mesofílica no es eficiente. Sin embargo, en el ensayo de potencial de metano a 35 °C se obtienen los valores esperados (aprox. un rendimiento del 60%).

Abstract

This Final Degree Project is part of the CTM2015 - 64810 - R project that are carried out by the Environmental Technology research group (TEP-181). The objective is the study of anaerobic co-digestion in separate phases in mesophilic range, of sludge and food waste (stillage and chicken manure). Batch biodegradability tests are performed for different steps that carry out sequentially. Hydrogen is generated at the first stage (BHP) and methane in the second one (BMP), depending on the optimal pH and temperature conditions of each process.

According to the results obtained, it has been proven that the mesophilic BHP is not efficient. However, in the methane potential test at 35 ° C it obtained the expected values (approximately 60% yield).

1. Introducción

El abundante uso de combustibles fósiles supone un problema actualmente, ya que se trata de un recurso no renovable y su reserva es limitada (Mohan et al., 2007). Además, su consumo genera gran cantidad de gases de efecto invernadero aumentando de manera significativa el Potencial de Calentamiento Global (Mills et al., 2014).

Ante estas cuestiones la Digestión Anaerobia supone una excepcional alternativa en cuanto a la producción de energía sostenible y desarrollo de la economía circular (Antoniou et al., 2019). Por ello, una posible solución sería la utilización como biocombustibles del hidrógeno (Mohan et al., 2007) y metano generados a partir de la degradación de biosólidos y otros residuos agroalimentarios (Solera et al., 2018). Este biogás producido en la digestión anaerobia se convierte en electricidad a través de sistemas CHP (Combined Heat and Power) (Mills et al., 2014), con la ventaja de que este proceso tiene menor impacto ambiental que la propia gestión de los residuos por separado. (Edward et al., 2017).

2. Antecedentes bibliográficos

2.1. Descripción y problemática de los sustratos

2.1.1. Lodos de EDAR

Los lodos son el producto semisólido que se originan a partir del efluente de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), una vez éstas han sido tratadas mediante procedimientos físicos, químicos y biológicos (Amador-Díaz et al., 2015). Se consideran lodos de depuración: “lodos residuales salidos de todo tipo de estaciones depuradoras de aguas residuales de composición similar a las anteriormente citadas, así como los procedentes de fosas sépticas y de otras instalaciones de depuración similares utilizadas para el tratamiento de aguas residuales”, según el R.D. 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de lodos de depuración en el sector agrario.

2.1.1.1. Características

Los lodos están formados por una mezcla de sólidos (sustancias en suspensión o disueltas) y un alto porcentaje de agua ($> 95\%$). A pesar de que su composición varía en función de la carga contaminante, estos biosólidos suelen tener gran cantidad de materia orgánica oxidable, sólidos en suspensión, patógenos, sustancias tóxicas (metales pesados y contaminantes orgánicos) y algunas materias de interés (MITECO, 2019).

2.1.1.2. Problemas

Uno de los principales problemas de los lodos de depuración de aguas residuales urbanas es su elevada producción, llegando a ser en España de unos 108 kg·hab/año. Debido a la composición potencialmente contaminante de estos grandes volúmenes de biosólidos es necesario que se lleve a cabo una gestión adecuada (MITECO, 2019). En las EDARs los lodos son sometidos a diferentes tratamientos con el fin de disminuir patógenos presentes y contaminantes con la finalidad de cumplir la normativa vigente. Sin embargo, la generación de fangos de depuración va a seguir siendo una dificultad, ya que la cantidad de estaciones depuradoras sigue incrementando día a día (Amador-Díaz et al., 2015).

2.1.2. Vinazas de vino

Las vinazas de vino son el residuo que se obtiene en la destilación en la industria alcoholera (Alonso et al., 2015). Se produce a partir de la fermentación alcohólica de materia celulósica, cuya finalidad es producir etanol de forma natural (Kharayat, 2020).

2.1.2.1. Características

Las vinazas se caracterizan por ser un fluido marrón, con pH ácido y altas cargas orgánicas (debido a la presencia de proteínas, azúcares, ceras, melanoidinas y otros contaminantes de origen orgánico) (Chowdhary et al., 2018).

2.1.2.2. Problemas

La destilería es una de las industrias más contaminantes en el mundo, ya que generan gran cantidad de residuos al año (Chowdhary et al., 2018). Así, la cantidad de vinazas obtenida en el proceso es muy elevada en comparación con la generación de vino; se generan 15 L de vinazas por cada litro de vino (Kharayat, 2020).

Además, su alto contenido en compuestos orgánicos, así como su bajo pH y su alta temperatura también suponen un perjuicio para el planeta (Alonso et al., 2015). Destacan además como contaminantes recalcitrantes las melanoidinas, que son difícilmente biodegradables (Chowdhary et al., 2018).

Actualmente, las mejores alternativas de gestión de las vinazas implican su valorización energética mediante el proceso de digestión anaerobia utilizando diferentes tecnologías.

2.1.3. Gallinazas

La gallinaza es el residuo producido por las aves en sistemas intensivos de producción. Se considera un abono de origen orgánico, cuyo manejo inadecuado puede llegar a ser muy perjudicial para el medio ambiente (Pareja, 2005).

2.1.3.1. Características

La composición de este residuo es principalmente materia orgánica (proteínas, lignina, celulosa, hemicelulosa y ácidos grasos volátiles (AGV) (Marín et al., 2015). El desecho gallinaza también tiene un alto contenido en patógenos y puede provocar la reproducción de vectores (Pareja, 2005). Normalmente, la gallinaza se encuentra mezclada con paja u otro material estructurante constituyendo lo que se conoce como cama.

Las características de la cama dependen de diferentes factores tales como la alimentación, edad de las aves, temperatura, etc. Por tanto, la composición cambia en función del momento de recogida del residuo, tipo de almacenamiento y ave de origen (Pareja, 2005).

2.1.3.2. Problemas

A causa de su alto nivel contaminante por material orgánico y su capacidad de contener microorganismos y vectores, supone un peligro para el ser humano y el medio ambiente. Es más, según la legislación europea está prohibida su utilización si el producto no es fresco (Pareja, 2005). La gestión actual de estos residuos suele ser mediante compostaje, aunque también pueden ser valorizados mediante metanización.

2.2. Digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA) es un proceso microbiológico natural de degradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno que puede dividirse en 4 etapas (Hidrólisis, Acidogénesis, Acetogénesis y Metanogénesis). Los productos finales de estas reacciones son biogás y un digestato estable (Silva et al., 2018).

El biogás esta principalmente formado por metano (50-70%), dióxido de carbono (30%-50%) y otros componentes en menor proporción, aunque su composición puede variar en función de la materia prima y el proceso al que se someta (Acosta & Abreu, 2005).

La digestión anaerobia es una de las tecnologías más utilizadas en las EDAR para el tratamiento biológico de los lodos generados en las mismas (Amador-Díaz et al., 2015). Además, la DA es clave para el desarrollo de la economía circular ya que puede contribuir a la generación de energía, gestión de residuos y producción de manera sostenible. (Antoniou et al., 2019). En el *Anexo I* se presentan las diferentes alternativas.

Las etapas que tienen lugar consecutivamente durante el proceso de DA son (*Figura 1*):

- Hidrólisis: es el primer paso en el cual los compuestos orgánicos complejos se descomponen por hidrólisis en moléculas más simples y de menor tamaño como

aminoácidos, azúcares y ácidos grasos simples (Kirk & Gould, 2020). Las encargadas de llevar a cabo este proceso son las bacterias hidrolíticas que actúan como exoenzimas en el exterior de la célula (Acosta & Abreu, 2005).

- Acidogénesis: es el siguiente paso de la DA que tiene como objetivo continuar descomponiendo las moléculas que aún son relativamente grandes. Las bacterias acidogénicas encargadas de este proceso generan un medio ácido (Kirk & Gould, 2020). Los principales productos de esta etapa son los AGV (acético, propiónico y butírico) (Acosta & Abreu, 2005).
- Acetogénesis: los productos de la etapa anterior se transforman en ácido acético, CO_2 e hidrógeno (Acosta & Abreu, 2005) que son utilizados posteriormente para la producción de metano. Los organismos encargados del proceso son las bacterias acetogénicas (Kirk & Gould, 2020).
- Metanogénesis: en la etapa final del proceso las *Archaea* metanogénicas crean metano a partir del ácido acético, combinaciones de H_2 y CO_2 y otras sustancias (Acosta & Abreu, 2005). En esta etapa es donde se estabiliza realmente la materia orgánica dando lugar al digestato (Ramos, 2015).

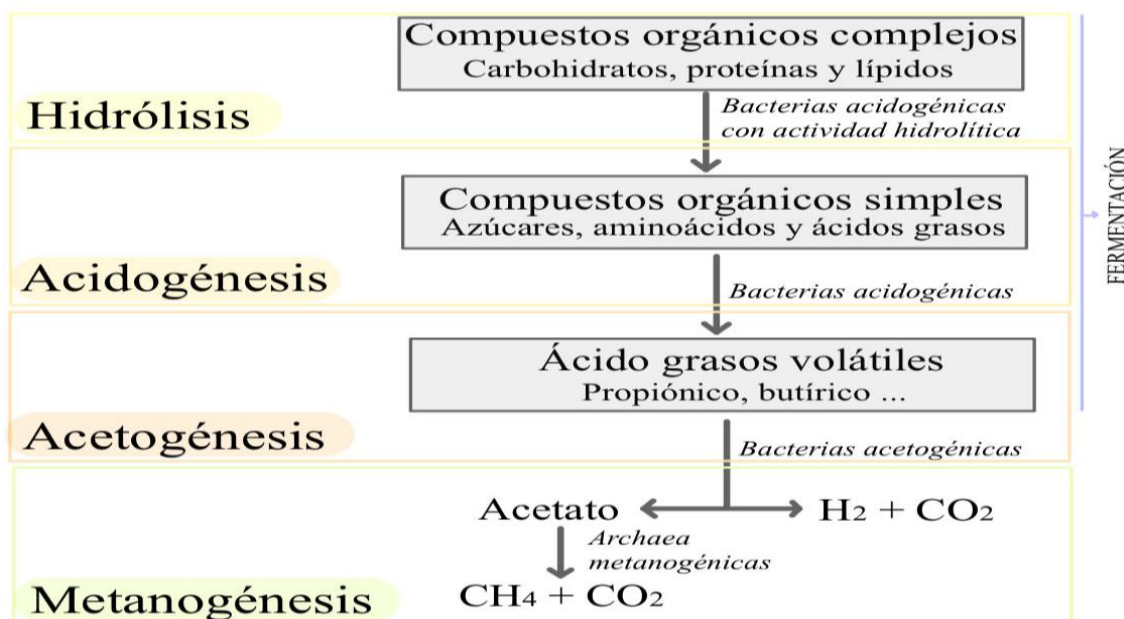


Figura 1. Fases del proceso de Digestión Anaerobia y sustratos intermedios. Fuente: Elaboración propia

2.2.1. Parámetros de operación

Como se ha comentado previamente, la DA es un proceso complejo que requiere unas condiciones de operación definidas para su correcto desarrollo, así como la asociación equilibrada entre las diferentes poblaciones microbianas (Kirk & Gould, 2020). Los principales parámetros de operación de los que depende el proceso son:

- **Sustratos/Inóculo** → La calidad de estos factores es fundamental, así como su composición y relación de microorganismos, ya que de ello dependerá la biodegradabilidad del proceso (Gonçalves, 2013).
- **Temperatura** → La temperatura es una de las principales variables fisicoquímicas de operación que afecta la velocidad global del proceso, a la actividad de los microorganismos, a la constante de equilibrio, a la solubilidad de los gases y al tipo de microorganismos presentes en el medio (Acosta & Abreu, 2005). Para que el proceso sea óptimo es necesario que la temperatura sea constante. Se distinguen hasta 4 rangos de temperatura diferentes: Psicrófilo (15–20°C), Mesófilo (33–40°C), Termófilo (50–60°C)(Ramos, 2015) e Hipertermófilo (65-70 °C)(Lee et al., 2008).
- **pH** → Cada grupo bacteriano actúa de forma óptima en unas determinadas condiciones de pH. Así, mientras que las bacterias fermentativas funcionan a pH ácido (5-5,5) (Kirk & Gould, 2020), las *Archaeas* metanógenas actúan en torno a pH de 6,8-7,2 y por debajo de este rango se inhiben. La familia metanogénica es más sensible a los cambios medioambientales de pH, por lo que si operamos en una sola etapa tendremos que ajustar el pH a valores óptimos para las bacterias metanogénicas, en torno a 7. Sin embargo, en los procesos con separación de fases las ácido-bacterias serán las predominantes y operarán a pH 5-5,5 para generar hidrógeno (Silva et al., 2018) mientras que en la segunda etapa serán las *Archaeas* metanógenas las que operen a pH ligeramente por encima de 7 (Cleves et al., 2016).
- **Agitación** → Es conveniente que el grado de agitación sea adecuado con el fin de que la mezcla sea homogénea y la distribución de temperatura uniforme (Ramos, 2015).

2.2.2. Tipos de digestión anaerobia

Existen diferentes alternativas tecnológicas para llevar a cabo el proceso de digestión anaerobia, entre ellas la digestión monoetapa, la digestión en fases de temperatura y la digestión con separación de fases. Asimismo, la co-digestión supone otra modificación operativa que mejora el proceso de digestión individual de sustratos.

2.2.2.1. Digestión anaerobia monoetapa.

El proceso de DA se lleva a cabo en un digestor a una determinada carga orgánica que depende de la naturaleza del sustrato y siendo la temperatura un parámetro clave de operación. El proceso de digestión anaerobia se puede desarrollar en diferentes rangos de temperatura, siendo los más comunes los rangos mesofílicos (35°C) y termófilo (55°C). Sin embargo, a mayor temperatura las altas tasas metabólicas de los microorganismos

termofílicos e hipertermofílicos permiten trabajar a bajos tiempos de retención hidráulico, altas cargas orgánicas y presentando elevadas tasas de crecimiento específico en comparación con sus homólogos mesofílicos, lo que tiene como resultado un incremento del potencial metanogénico y la posibilidad de disminuir el tamaño del reactor. No obstante, la calidad de deshidratabilidad de los lodos residuales son menores en el tratamiento mesofílico y, además, requiere de energía adicional para el calentamiento del digestor. Por ello las condiciones mesofílicas, a pesar de no eliminar patógenos, son las más implantadas en España para reducir el volumen de los lodos de depuradora y obtener energía en forma de gas metano (Riau et al., 2010).

2.2.2.2. Digestión anaerobia en fase de temperatura (TPAD)

Este proceso consiste en llevar a cabo la DA en diferentes reactores termofílico y mesofílico colocados en serie (Song et al., 2004). El objetivo de la técnica TPAD (Temperature – Phased Anaerobic Digestion) es combinar las ventajas de ambos procesos reduciendo sus limitaciones individuales y mejorando el rendimiento de producción de metano, así como la estabilidad del proceso y la calidad del efluente en cuanto a sus propiedades agronómicas y ausencia de patógenos (Riau et al., 2010).

2.2.2.3. Digestión anaerobia con separación de fases

En esta tecnología la coproducción de metano e hidrógeno se desarrolla en dos reactores secuenciales en los que se ha provocado de forma intencionada la separación del proceso en las dos fases microbianas que conforman el proceso. En el primer reactor se genera hidrógeno mediante hidrólisis y acidogénesis de las moléculas orgánicas presentes en el medio. En el siguiente reactor se lleva a cabo la acetogénesis y metanogénesis de las moléculas generadas en la etapa anterior, produciéndose metano. Para ello, es preciso que cada reactor trabaje en las condiciones fisicoquímicas adecuadas para favorecer el desarrollo de las diversas poblaciones microbianas de forma diferenciada. Este proceso consigue mejorar el rendimiento global de producción de energía al generar H_2 y CH_4 y disminuir la carga orgánica final del efluente (Silva et al., 2018).

2.2.2.4. Co-digestión anaerobia (CodAn)

La co-digestión anaerobia consiste en el tratamiento conjunto de biosólidos y residuos agroalimentarios en el mismo reactor. Este método hace que la producción de biogás sea más eficiente debido a que los residuos en conjunto tienen un efecto sinérgico, de manera que aumenta la cantidad de nutrientes necesarios. Además, el digestato final obtenido es más estable (Edward et al., 2017).

La co-digestión mesofílica tiene mejores resultados de biodegradabilidad que la termofílica, a pesar de que producen aproximadamente los mismos porcentajes de metano (Solera et al., 2018). Aunque la opción termofílica es mejor para la eliminación de patógenos, reducción de sólidos y generación de biogás, es un proceso inestable y genera altas concentraciones de AGV. Debido a esto, la DA en rango mesofílico es la alternativa más utilizada actualmente (Riau et al., 2010).

El trabajo Fin de Grado que se presenta se enmarca dentro plan de trabajo del Proyecto de Investigación “*Gestión de residuos agroalimentarios y lodos en el marco de la economía circular: producción de energía y fertilizantes mediante co-digestión anaerobia en planta piloto*” (P18- RT-1348) del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI 2020) que engloba el estudio de la co-digestión anaerobia de lodos y residuos agroalimentarios (vinazas y gallinaza) utilizando la tecnología con separación de fases de microorganismos a una temperatura de operación de 35°C (mesofílico) y fases secuencial de temperatura.

2.2.3. Test de biodegradabilidad anaerobia

Los ensayos de Potencial Bioquímico de Hidrógeno (BHP) y de Potencial Bioquímico de Metano (BMP) son herramientas que se desarrollan a escala de laboratorio y sirven para evaluar la biodegradabilidad anaerobia acidogénica y metanogénica, respectivamente de los sustratos (Silva et al., 2018). Se trata de experimentos de simple ejecución, poco costosos y relativamente rápidos (Cleves et al., 2016).

Los experimentos se llevan a cabo en régimen discontinuo o en batch y se desarrollan en botellas de cristal opaco de 250 mL cerrados herméticamente y en ausencia de oxígeno (Tyagi et al., 2014). En el interior de las botellas se introduce los sustratos que queremos analizar junto con el inóculo acidogénico o metanogénico, en el caso de BHP o BMP respectivamente y bajo condiciones de operación definidas en cuanto a pH, temperatura de operación y agitación (Cleves et al., 2016). Asimismo, es necesario definir la proporción de inóculo frente a sustratos.

En inóculos anaerobios mixtos, la coexistencia de *Archaeas* metanógenas y bacterias fermentativas en el mismo reactor tiene un efecto positivo; no obstante, en procesos con separación de fases es necesario controlar las condiciones de pH y temperatura, de forma que si estas condiciones cambian también lo hace la relación entre los microorganismos acidogénicos y metanogénicos responsables del proceso (Kirk & Gould, 2020).

Los objetivos de los test de biodegradabilidad BHP y BMP son los siguientes:

- Determinar la biodegradabilidad anaerobia acidogénica y metanogénica de los diferentes sustratos orgánicos.
 - Identificar la producción máxima de biogás expresada como hidrógeno y metano, según el tipo de test.
 - Reconocer la capacidad de resiliencia de los microorganismos.
 - Predecir, a escala de laboratorio la cinética de degradación de los sustratos.
- (Cleves et al., 2016)

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la biodegradabilidad anaerobia acidogénica y la biodegradabilidad metanogénica en fase secuencial de mezclas de lodos, vinazas y gallinaza operando en rango mesofílico para la producción de Biohidrógeno y Biometano. Los objetivos específicos propuestos son:

- Analizar el rendimiento del proceso de digestión anaerobia acidogénica de mezclas de lodos, vinazas y gallinaza operando en rango mesofílico mediante test BHP.
- Analizar el rendimiento del proceso de digestión anaerobia metanogénica mediante test BMP de la mezcla de lodos, vinazas y gallinaza procedente del ensayo BHP previo operando en rango mesofílico.
- Analizar cómo afecta la adición de gallinaza al proceso de digestión anaerobia mesofílica con separación de fases de la mezcla lodos + vinazas (50:50).
- Comparar el proceso de digestión anaerobia mesofílica con separación de fases de la mezcla lodos + vinazas (50:50) con trabajos previos bibliográficos y del Grupo de Investigación TEP-181.
- Determinar si el proceso de co-digestión mesofílica con separación de fases es el más adecuado para la producción de metano.

4. Materiales y métodos

A continuación, se recoge la metodología científica utilizada para el desarrollo del presente trabajo experimental, así como los equipos, materiales y técnicas utilizadas para la elaboración del mismo en los laboratorios del Grupo de Investigación Tratamiento Biológico de Residuos (TBR) del Departamento de Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz.

4.1. Plan de trabajo

Para lograr los objetivos se propone un plan de trabajo basado en el desarrollo de dos test de biodegradabilidad consecutivos, BHP y BMP, según el esquema del *Anexo II*.

Para el correcto seguimiento de los ensayos se requiere, en ambos casos, la caracterización inicial de los sustratos por separado y de las mezclas y del inóculo antes de introducirlos en una incubadora orbital, la cual se mantiene en constante agitación y a la temperatura óptima dentro del rango mesofílico (35°C). Además, es necesario realizar una caracterización final de las muestras tanto en los ensayos BMP como BHP.

Asimismo, es preciso realizar la validación del ensayo para lo cual se realiza un control del inóculo como elemento de referencia (Gonçalves, 2013). También se tiene en cuenta el número de réplicas para verificar la fiabilidad de los resultados (Cleves et al., 2016).

4.2. Caracterización

La caracterización de los sustratos implica el análisis fisicoquímico de los diferentes parámetros, con el fin de estudiar la evolución de la composición y degradabilidad de los sustratos en el tiempo.

En la caracterización inicial se analizan las muestras de los residuos por separado y las mezclas con y sin inóculo, mientras que la caracterización final se realiza sobre la mezcla más el inóculo, es decir, el contenido de cada botella.

Los parámetros de caracterización fueron: concentración de materia orgánica total y disuelta (medida como demanda química de oxígeno total (DQOt) y soluble (DQOs)), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), pH y ácidos grasos volátiles (AGV).

Los resultados de esta etapa se recogen en el *apartado 5 de Resultados y Discusión*.

4.2.1. Residuos e inóculo

Los sustratos que se han utilizado para este estudio son Lodos de EDAR y residuos agroalimentarios (Vinazas de vino y Gallinaza).

Tabla 1. Residuos y procedencia.

Residuo	Origen
Lodos	Estación Depuradora de Aguas Residuales Guadalete situada en el municipio de Jerez.
Vinazas	Bodega Gonzalez-Byass, S.A. ubicada en Jerez de la Frontera.
Gallinazas	Empresa Marta Aragón S.L. localizada en Medina Sidonia.

Como inóculo se usó el efluente mesofílico de un reactor perteneciente al laboratorio de Tratamiento Biológico de Residuos de la Universidad de Cádiz, que operaba de forma estable en el momento de su toma de muestra.

4.2.2. Sustratos mezcla

En estudios previos del Grupo de Investigación se ha probado que las mejores proporciones de los sustratos para la producción de biogás son las siguientes:

Tabla 2. Proporciones de los sustratos mezclas.

Lodos + Vinazas	50:50
Lodos + Vinazas + Gallinazas	50:50:10(g/L)

La producción de hidrógeno se ve favorecida por la adición de vinaza a la fermentación de lodos en relación 50:50 (Tena et al., 2020). Por otro lado, la combinación más adecuada para la co-digestión de L:V:G es la adición de 10 g/L a la mezcla anterior según investigaciones previas del Grupo de investigación TMA de la Universidad de Cádiz (Zahedi et al., 2020).

Como etapa previa, es preciso diluir la gallinaza antes de realizar las mezclas con lodos

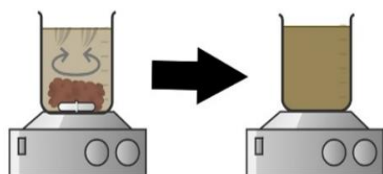


Figura 2. Método de disolución para la gallinaza. Fuente: Elaboración propia.

y vinazas y proceder a la realización de los análisis (exceptuando la medición de ST y SV). Para ello, se añaden los gramos necesarios de gallinaza a la mezcla de lodos-vinazas y se procede a su agitación mediante un agitador magnético (Figura 2).

4.3. Test de Biodegradabilidad BHP y BMP

El estudio global abordado está conformado por dos ensayos consecutivos en discontinuo, según se recoge en el esquema de la Figura 2. Podemos diferenciar dos conjuntos de test:

- Ensayos de Potencial Bioquímico de Hidrógeno (BHP)
- Ensayo de Potencial Bioquímico de Metano (BMP)

La co-digestión anaerobia se ha llevado a cabo en reactores batch (Figura 3) con una capacidad de 250 mL, cuyo volumen útil es de 120 mL. El volumen restante (130 mL) es el espacio en dónde se almacena el biogás producido diariamente.

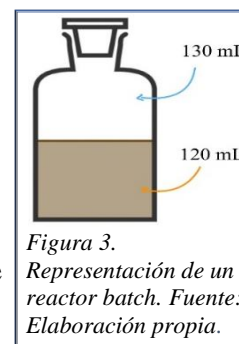


Figura 3. Representación de un reactor batch. Fuente: Elaboración propia.

Inicialmente se llenan los reactores con las mezclas definidas y el inóculo y se procede a extraer el aire de las botellas al inicio de cada ensayo pasando una corriente de nitrógeno, con la finalidad de eliminar el oxígeno en el espacio en cabeza.



Para poder mantener la temperatura y agitación necesaria durante el proceso de biodegradación se utiliza una incubadora orbital a 35 °C y constante movimiento (*Figura 4*).

Figura 4. Incubadora de régimen mesofílico. Fuente: Elaboración propia.

La evolución de cada ensayo se realiza a partir de la medición diaria del volumen y composición del biogás generado (hidrógeno y/o metano, en cada caso). Los ensayos se mantienen operativos hasta que la tasa de producción es prácticamente nula.

4.3.1. Montaje y operación de los ensayos BHP

Para el montaje de la primera parte del estudio, enfocada a la producción de hidrógeno, se necesitaron 12 botellas. Cada una estaba formada por 60 mL de inóculo y 60 mL de mezcla; cinco de ellas con L+V y otras cinco con L+V+G(10g/L). También se integraron 2 botellas más a modo de blanco con la composición Inóculo+Agua destilada, que sirvieron como control del proceso. Dicho montaje se representa en la *Figura 5*.

Debido a que la finalidad de este ensayo es la producción de hidrógeno, es necesario reducir el pH a 5 - 5,5 con ácido clorhídrico (HCl) ya que entre esos valores las *Archaeas* metanogénicas se encuentran inhibidas.

Esta prueba de biodegradabilidad se mantuvo en la incubadora hasta que la producción acumulada de hidrógeno fue constante; dicho de otra forma, hasta que su producción neta fue menor del 1%.

Se caracterizaron las variadas sustancias al inicio (sustratos y mezclas) y el contenido de las botellas al final del ensayo. Se extrajeron 16 mL de cada botella para ésta última. Los resultados pueden encontrarse en el *apartado 5.2. de Resultados y Discusión*.

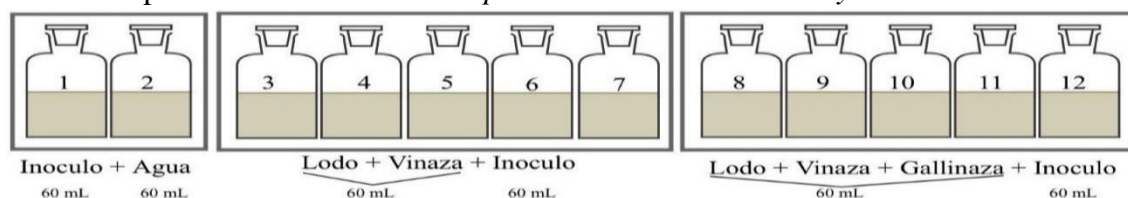


Figura 5. Representación esquemática del resultado del ensayo BHP. Fuente: Elaboración propia

4.3.2. Montaje y operación de los test BMP

Esta segunda fase, basada en la producción de metano, se montó a partir de las mezclas resultantes del ensayo anterior. Los reactores que contenían los mismos sustratos se mezclaron en 2 vasos de precipitados. Partiendo del volumen extraído para la

caracterización final de la etapa anterior y que la degradación de los sustratos durante el ensayo hace que el volumen útil disminuya, quedaron 500 mL de cada mezcla a repartir en los nuevos reactores batch. En este punto se decidió bifurcar el estudio. El montaje de esta etapa se representa en la *Figura 6*.

Por un lado, se trasvasaron 240 mL a dos botellas, directamente a partir de cada mezcla, cambiando únicamente su pH (aumentándolo a pH 7).

Por otro lado, se utilizaron 120 mL de la mezcla que se combinaron con 120 mL de inóculo mesofílico (mismo reactor de laboratorio). Los 60 mL restantes se aprovecharon para la caracterización inicial de esta nueva combinación.

Los resultados pueden encontrarse en el *apartado 5.2. de Resultados y Discusión*.

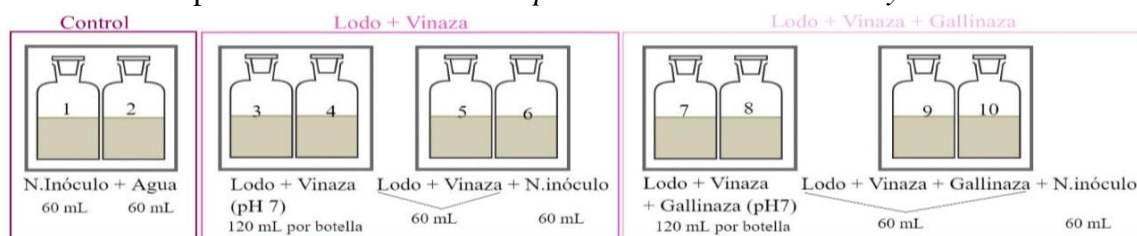


Figura 6. Representación esquemática del resultado del ensayo BHP. Fuente: Elaboración propia.

4.4. Rendimiento de los procesos

Para el análisis final de los ensayos y con el fin de poder comparar los resultados experimentales con otros obtenidos en el seno del Grupo de Investigación y con otros resultados de la bibliografía, se calcularán los rendimientos de cada proceso en base al porcentaje de eliminación de DQO total y soluble, el rendimiento de hidrólisis y el porcentaje de eliminación de ST y SV, calculados a partir de siguientes expresiones matemáticas:

Ecuación 1. Expresiones matemáticas de rendimiento.

$$\begin{aligned} \text{Eliminación DQOt (\%)} &= \left(\frac{\text{DQOto (mi)} - \text{DQOf (mi)}}{\text{DQOto (mi)}} \right) * 100 & \text{DQOto (mi): valor de DQO total al inicio del estudio de la muestra i} \\ & & \text{DQOf (mi): valor de DQO total al final del estudio de la muestra i} \\ \text{Eliminación DQOs (\%)} &= \left(\frac{\text{DQOso (mi)} - \text{DQOsf (mi)}}{\text{DQOso (mi)}} \right) * 100 & \text{DQOso (mi): valor de DQO soluble al inicio del estudio de la muestra i} \\ & & \text{DQOsf (mi): valor de DQO soluble al final del estudio de la muestra i} \\ \text{Rendimiento de hidrólisis (\%)} &= \left(\frac{\text{DQOsf (mi)}}{\text{DQOso (mi)}} \right) * 100 \\ \text{Eliminación ST (\%)} &= \left(\frac{\text{STo (mi)} - \text{STf (mi)}}{\text{STo (mi)}} \right) * 100 & \text{STo(mi): Concentración de sólidos totales al inicio del estudio de la muestra i} \\ & & \text{STf (mi): Concentración de sólidos totales al final del estudio de la muestra i} \\ \text{Eliminación SV (\%)} &= \left(\frac{\text{SVo (mi)} - \text{SVf (mi)}}{\text{SVo (mi)}} \right) * 100 & \text{SVo(mi): Concentración de sólidos volátiles al inicio del estudio de la muestra i} \\ & & \text{SVf(mi): Concentración de sólidos volátiles al final del estudio de la muestra i} \end{aligned}$$

4.5. Equipos y técnicas analíticas

Los diversos equipos que han sido utilizados para la manipulación y medición de los sustratos según las técnicas elegidas vienen ilustrados en el *Anexo III*.

Los métodos que han sido utilizados para el análisis de las diferentes muestras durante el desarrollo del estudio forman parte de los Métodos Normalizados para el Análisis de aguas potables y residuales (APHA; AWWA; WPCF; 1989).

La caracterización fisicoquímica se realiza para cada sustrato estudiado. Es decir, se realizan las determinaciones analíticas tanto para los residuos y el inóculo por separado, como para las mezclas con y sin inóculo. De la misma manera se realiza la caracterización final de las mezclas al final de cada ensayo en cada reactor batch.

4.5.1. Demanda Química de Oxígeno

Para la medición de DQO se ha utilizado el método colorimétrico normalizado 52020D por espectrofotometría (*Figura 7*) según la APHA – AWWA – WPFC.

Primero es necesario encender los termo - reactores que vayan a utilizarse. Se ponen a una temperatura de 150°C con un tiempo indeterminado de ∞ .

Seguidamente se preparan las diluciones, las cuales son diferentes para cada sustrato:

- Gallinaza \rightarrow 1:100
- Vinaza \rightarrow 1:25
- Lodos y mezclas \rightarrow 1:50

Una vez hecha las diluciones, el procedimiento difiere entre DQO total y DQO soluble. Ambos se realizan por triplicado para cada muestra.

Para la DQOt se extraen 2,5 mL de la dilución con una micropipeta y se añade a cada tubo de digestión. Mientras que para la DQOs, la dilución se introduce en un tubo Falco y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos. Al igual que antes sacamos del sobrenadante 2,5 mL y se añaden a cada tubo.

Después se adicionan a todos los tubos digestores 1,5 mL de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) y 3,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4); disoluciones que ya se encuentran preparadas en el laboratorio.

El siguiente paso es asegurar los tapones de los tubos e introducirlos en el termo-reactor previamente calentado, durante 2 horas. Una vez han transcurrido el tiempo, se sacan los tubos y se dejan enfriar en un baño de agua fría.

Finalmente se procede a medir la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 585 nm. Los datos que se obtienen vienen dados en g/L y hacen referencia a los g de oxígeno necesarios para que se oxide 1L de muestra.

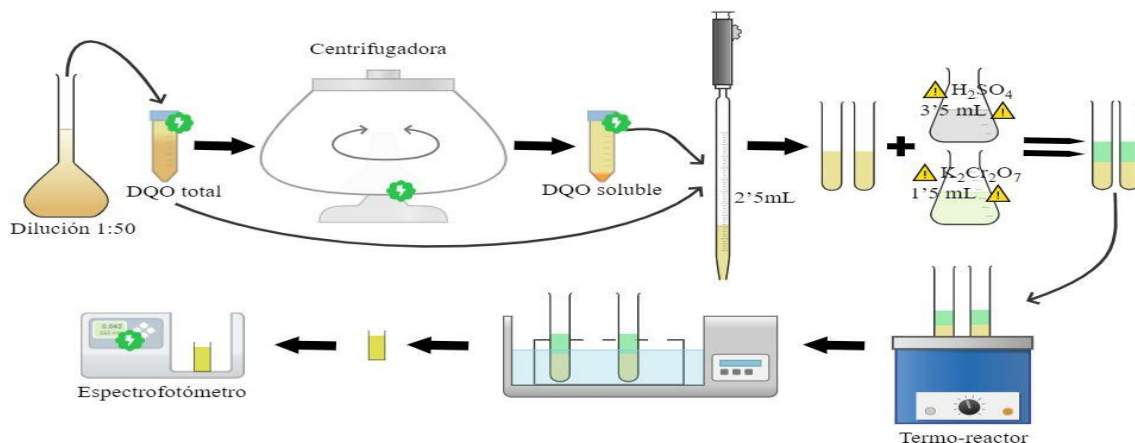
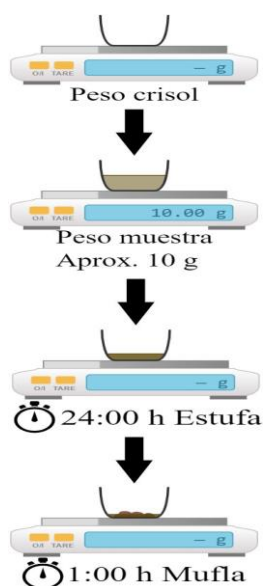


Figura 7. Representación esquemática de la metodología para la DQO. Fuente: Elaboración propia.

4.5.2. Sólidos Totales y Sólidos Volátiles

Para la determinación de Sólidos se ha utilizado el método 2540G por gravimetría (Figura 8) de la APHA-AWWA-WPFC.



Utilizamos un crisol de porcelana como recipiente para las muestras y una balanza.

Primero se pesa el crisol que previamente ha sido secado y enfriado en un desecador. Se introducen en el mismo aprox. 10 g de muestra. Posteriormente se deja el crisol en una estufa a 105 °C durante 24 horas y vuelve a pesarse, esta vez la muestra seca. De esta forma, por diferencia de pesadas, se obtienen los ST.

Más tarde, se introduce el crisol en una mufla durante 1 hora, se deja enfriar y nuevamente se pesa. Así por diferencia entre las pesadas obtenemos los SV.

Figura 8. Representación esquemática de la metodología para ST y SV. Fuente: Elaboración propia.

4.5.3. pH

La medida de pH siguió el método normalizado 4500B por electrometría según la APHA-AWWA-WPFC (Figura 9). Se utilizó un pH-metro SensION™+, el cual se calibraba diariamente a pH de 4, 7 y 9.

Medir el pH consiste principalmente en sumergir el electrodo de pH-metro en la muestra homogénea.

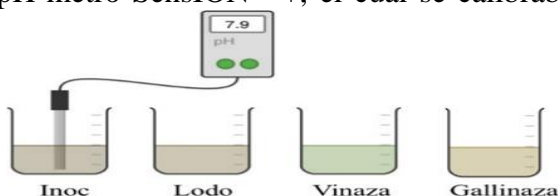


Figura 9. Representación esquemática de la metodología para medir pH. Fuente: Elaboración propia.

4.5.4. Ácidos Grasos Volátiles

La medida de AGV se realiza mediante cromatografía de gases. La preparación de las muestras sigue el procedimiento representado en la Figura 10.

Para comenzar con la medición de esta variable se prepara una dilución 1:4. Primero en un tubo Falco se adicionan 25 mL del sustrato y 25 mL de agua y se centrifuga durante 10 minutos. Una vez sale de la centrífuga, se extraen 25 mL del sobrenadante en otro tubo Falco y éste se centrifuga una segunda vez. Después se filtra la muestra en tubos Eppendorf a través de unos filtros de 0,22 μm con una jeringuilla.

Posteriormente se cogen 0,5 mL con una micropipeta y se adicionan a un vial. También es necesario añadir 0,5 mL de una solución 1:4 formada por fenol y ácido ortofosfórico respectivamente. Finalmente se introducen los viales en el cromatógrafo de gases, para determinar diferentes ácidos grasos volátiles como: acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, isocaproico, caproico y heptanoico.

Los resultados que se obtienen vienen dados en g_{eq} acético/L. Es necesario multiplicar los resultados x4, debido a las diluciones que se hicieron al inicio.

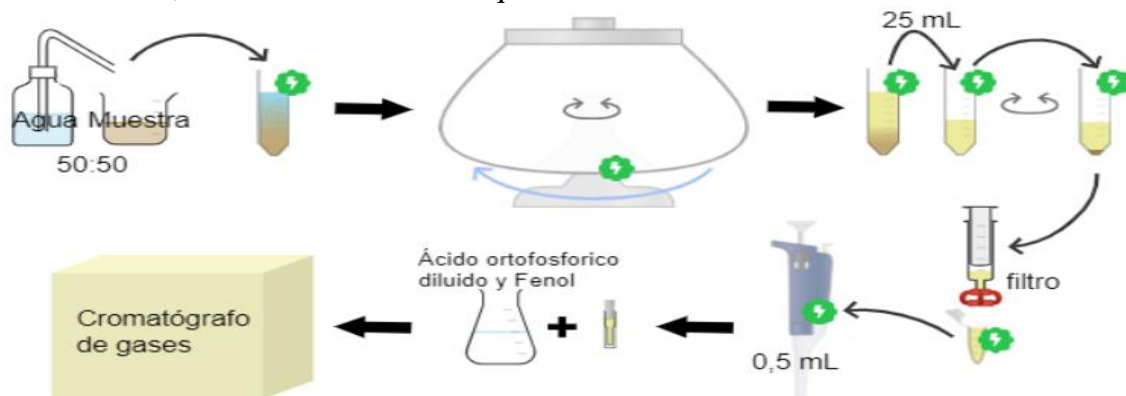


Figura 10. Representación esquemática de la metodología para AGV. Fuente: Elaboración propia.

4.5.5. Determinación de patógenos

Escherichia coli y coliformes totales → Para la medición de estos patógenos se ha utilizado el método de membrana filtrante 9222H según la APHA – AWWA – WPFC. El medio de cultivo para la detección de *E. coli* y coliformes totales es Microinstant ® CCA (Coliforms Chromogenic Agar).

Salmonella → la determinación de *Salmonella* se realizó mediante el método 9260B de la APHA – AWWA – WPFC. El medio para su detección es Agar XLD (Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato).

4.6. Medidas biogás

La finalidad del presente estudio es principalmente determinar la producción de biogás en cada una de las dos etapas del proceso, por lo que necesitamos conocer el volumen y la composición.

4.6.1. Presión

Debido a que no podemos cuantificar el volumen de biogás directamente en los reactores, se mide su presión y a partir de ese dato se calcula mediante la aplicación de la ecuación de los Gases Ideales la producción en mL/día. Para medir la presión se utiliza un manómetro.

Posteriormente se determina y se representa en una gráfica el volumen acumulado tanto del hidrógeno como del metano. Los resultados pueden verse en el *apartado 5.4. de Resultados y Discusión*.

4.6.2. Composición

La medición de la composición del biogás varía en función del ensayo. Los resultados se expresan como porcentaje de hidrógeno (H_2), metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2).

4.6.2.1. Hidrógeno

Se utiliza un cromatógrafo de gases para la determinación del gas hidrógeno. Se introduce en el equipo 0,25 mL del biogás empleando una jeringa de 1mL. En la pantalla queda representada la relación entre la concentración de los diferentes componentes del gas y los picos de respuesta.

4.6.2.2. Metano

Para la cuantificación del metano se utiliza un metanómetro. El procedimiento consiste en pinchar la cabeza de botella con una aguja que se conecta mediante una conducción de goma con el instrumento. Tras poner el marcha el aparato, los resultados se expresan en porcentaje de metano en el total de biogás.

5. Resultados y discusión

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo del estudio en las diferentes fases experimentales. Es preciso considerar que todas las mediciones analíticas se han hecho por triplicado y que solo se presentan los valores medios de los datos analizados.

5.1. Caracterización inicial

5.1.1. Residuos e inóculo

Cómo se describe en el *apartado 4.2.1.* dentro de *Materiales y métodos*, primero se realizó la caracterización fisicoquímica del inóculo y de los diferentes residuos (lodos, vinazas y

gallinaza). Los resultados obtenidos de los parámetros analizados en el comienzo del ensayo quedan recogidos en la *Tabla 3* y *Gráfico 1*.

Como puede observarse, el inóculo presenta valores de pH, DQOt y DQOs, y ST y SV típicos de un inóculo mesofílico estable (Tena et al., 2020).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos de los residuos y el inóculo.

Parámetros	Lodo	Vinazas	Gallinaza	Inóculo
pH	6.31±0.11	3.09±0.07	8.05±0.16	7.92±0.00
DQOt (gO ₂ /L)	49.39±0.01	42.45±0.00	95.92±0.01	46.18±0.01
DQOs (gO ₂ /L)	11.41±0.02	42.22±0.00	77.68±0.01	22.37±0.01
ST (g/L)	48.30±0.26	20.20±0.40	600.29±36.16	30.32±0.07
SV(g/L)	40.07±0.27	17.50±0.50	423.11±35.66	21.46±0.37

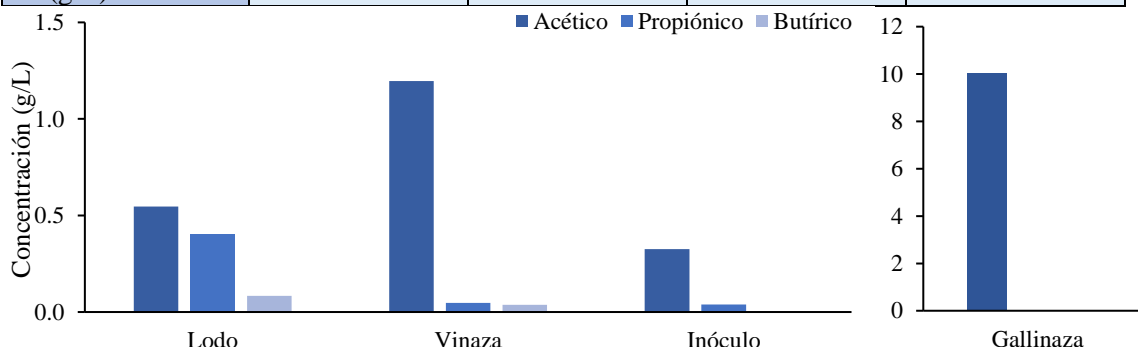


Gráfico 1. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (g/L) de los residuos y el inóculo.

En relación al pH inicial, se corresponde con lo esperado según lo descrito en el *apartado 2.1.* sobre las características de los sustratos. Cabe resaltar el carácter ácido de las vinazas y ligeramente básico de las gallinazas. Por otro lado, observamos que los lodos tienen una DQO total alta, pero la DQO soluble es muy baja y con gran cantidad de materia particulada. Esto hace que sean poco efectivos para producir metano, por lo que su co-digestión con otros residuos más biodegradables, como vinazas y gallinazas, permitirá mejorar mucho el rendimiento. Así, las vinazas presentan una DQO muy alta siendo prácticamente toda ella materia orgánica disuelta, contrariamente a los valores de los lodos. En cuanto a la gallinaza, aporta gran cantidad de DQOtotal y soluble, por encima de 40g/L, con gran cantidad de material particulado.

En el estudio de los AGV, puede verse cómo el ácido predominante es el acético. El residuo con mayor concentración de este ácido es la gallinaza, con un valor de 10 g/L. La elevada concentración de acético en la vinaza se debe al método de elaboración de los vinos y para el inóculo la presencia del acético podría deberse a su origen, ya que proviene del efluente acidogénico de un reactor mesofílico pretratado térmicamente, productor de hidrógeno (Tena et al., 2020).

5.1.2. Caracterización de las mezclas de sustratos

Cómo se describe en el apartado 4.2.1. dentro de *Materiales y métodos*, inicialmente se realizó la caracterización fisicoquímica de las mezclas LV y LVG antes de adicionar el inóculo en proporción 1:1. Los resultados obtenidos de los parámetros analizados quedan recogidos en la *Tabla 4* y *Gráfico 2* para el BHP y en la *Tabla 5* y *Gráfico 3* para el BMP.

5.1.2.1. BHP

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos de los sustratos sin el inóculo para el BHP.

Parámetros	(LV) _{BHP}	(LVG) _{BHP}
pH	4.73±0.00	4.97±0.01
DQOt (gO ₂ /L)	47.38±0.00	48.76±0.01
DQOs (gO ₂ /L)	22.26±0.01	21.91±0.01
ST (g/L)	43.32±0.89	36.63±0.54
SV(g/L)	36.45±0.61	29.94±0.40

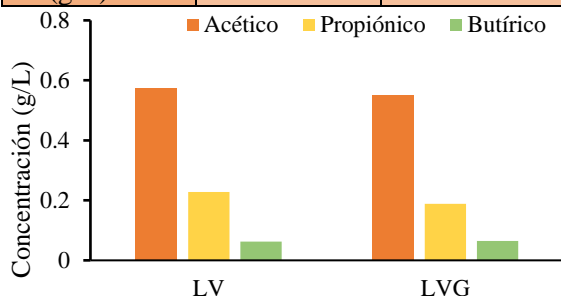


Gráfico 2. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (g/L) de las mezclas sin el inóculo para el BHP.

El dato de pH de la *Tabla 4* se corresponde al valor de las mezclas previas a la adición del inóculo. Una vez se añade el inóculo se produce un aumento del valor de pH, por lo que para el desarrollo de estos test BHP es necesario acidificar hasta 5-5,5 mediante la adición de ácido clorhídrico (diluido). Este pH es el adecuado para el desarrollo de la actividad bacteriana de los microorganismos productores de hidrógeno, ya que además se inhibe la actividad de los productores de metano.

5.1.2.2. BMP

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de los sustratos sin el inóculo para el BMP.

Parámetros	(LV) _{BHP}	(LVG) _{BHP}
pH	5.06±0.01	5.09±0.01
DQOt (gO ₂ /L)	41.36±0.00	46.24±0.01
DQOs (gO ₂ /L)	24.03±0.01	27.76±0.00
ST (g/L)	32.27±0.06	34.75±0.00
SV(g/L)	23.80±0.24	26.41±0.21

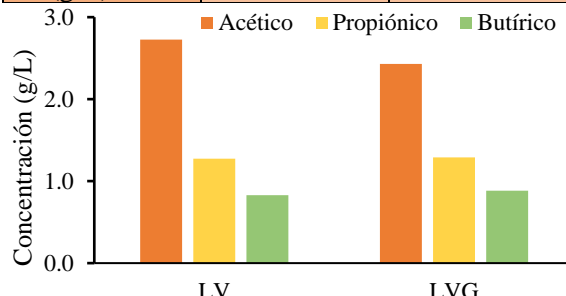


Gráfico 3. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (g/L) de las mezclas sin el inóculo para el BMP.

En el caso inicial del BMP, se observa que el pH del medio inicialmente es ácido, pues estas muestras se corresponden con el efluente del ensayo BHP. Dado que vamos a desarrollar test BMP, es necesario que los valores del medio sean neutros o ligeramente básicos. Debido a ello habría que aumentar dicho valor con hidróxido de sodio (1M). A dos botellas de cada mezcla únicamente se le aumenta su pH, mientras que al resto se le añade el inóculo metanogénico y se ajusta el pH en torno a 7, valor óptimo para la actividad de las *Archaeas* metanogénicas.

Ha de puntualizarse que los datos de los sustratos al inicio del ensayo BMP se corresponden con las mezclas finales del ensayo anterior, es decir, son el efluente del ensayo BHP. Además, los datos del BMP sin inóculo representan al sustrato inicial de las botellas del test al que solo se les aumentó el pH y no se añadió el inóculo. Cabe destacar que las mezclas a las que se les aumentó el pH en el BMP apenas produjeron metano (>1%), teniendo en cuenta que la producción normal es de 50-70%. Debido a esto, el estudio de la evolución de las botellas que contenían este sustrato no va a ser incluido en el análisis de los resultados de biodegradabilidad.

Por otro lado, existen diferencias entre el resto de los parámetros que se comentarán en *apartado 5.2. de Resultados y Discusión (test de biodegradabilidad)*.

5.2. Análisis de los test de biodegradabilidad

Cómo se ha comentado previamente en el *apartado 4.3.* se han llevado a cabo dos test de biodegradabilidad: test de potencial de generación de hidrógeno (BHP) y test de potencial de generación de metano (BMP). En ambos casos se realizó una caracterización de las mezclas al inicio y al final de cada ensayo.

5.2.1. Resultado de los test BHP

Los datos de la caracterización fisicoquímica inicial y final de los test BHP con los diferentes sustratos se muestran en la *Tabla 6* y *Grafica 4*.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de los sustratos en BHP

Parámetros		Control, C_{BHP}	$(LV)_{BHP}$	$(LVG)_{BHP}$
pH	Inicial	5.49±0.02	5.55±0.03	5.45±0.00
	Final	5.46±0.03	5.14±0.07	5.07±0.03
DQOt (gO ₂ /L)	Inicial	46.18±0.01	52.58±0.00	46.47±0.00
	Final	17.18±0.00	46.29±0.98	51.63±1.92
DQOs (gO ₂ /L)	Inicial	22.37±0.01	28.57±0.00	26.76±0.01
	Final	5.39±0.16	28.04±2.59	31.70±3.74
ST (g/L)	Inicial	30.32±0.07	41.39±0.16	43.46±0.01
	Final	21.05±0.25	32.54±0.32	34.11±0.63
SV(g/L)	Inicial	21.46±0.37	33.06±0.19	34.13±0.17
	Final	15.84±0.02	23.63±0.40	26.32±0.81

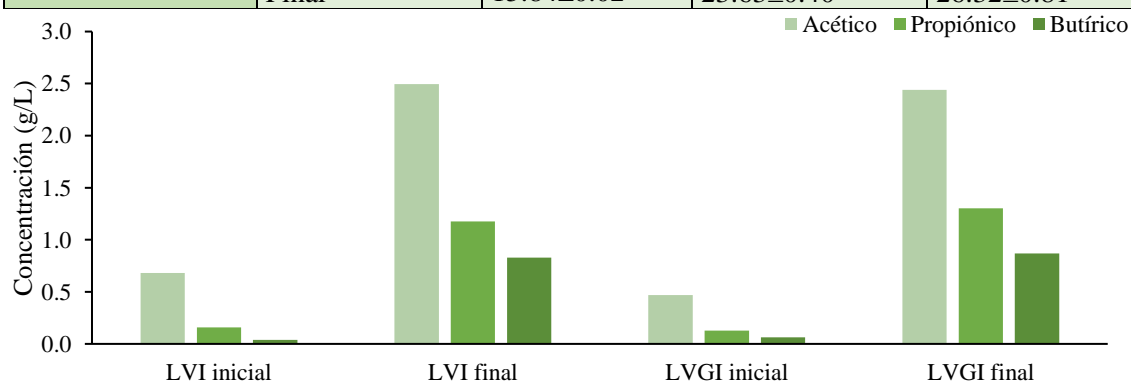


Gráfico 4. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (g/L) de los sustratos para el BHP.

La mezcla de inóculo+agua sirve como control del proceso (C) y permite determinar cuánto biogás se genera como consecuencia de la actividad del inóculo. Este valor será sustraído al dato global de hidrógeno generado en cada test.

El pH de operación en estos ensayos debe mantenerse en torno a 5,5. Sin embargo, durante el desarrollo del BHP y debido a la detección de metano en las muestras gaseosas, se dedujo que se había producido un aumento del pH en el medio (que favorecen la actividad de las *Archaeas* metanogénica), por lo que se procedió a abrir las botellas y acidificar de nuevo las mezclas hasta los valores recogidos en la *Tabla 7*.

Tabla 7. Disminución de pH en mitad del ensayo BHP.

Inóculo BHP	4,94	Aun así, se observa que el pH aumentó de nuevo al final del ensayo como consecuencia de la capacidad de autorregulación del sistema en función de la actividad microbiana (Zahedi et al., 2016).
(LV) _{BHP}	4,97	
(LVG) _{BHP}	4,84	

Respecto a los datos de DQO, los valores de DQO total y soluble disminuyen en el caso de LV mientras que aumentan para la mezcla LVG. Esto indica que se ha producido un consumo de materia orgánica para el sustrato LV, utilizada concretamente para la generación de metano que, aunque no deseado, se ha generado en el ensayo BHP. Sin embargo, para la muestra LVG, los valores de la DQO total y soluble aumentan. Esto se debe a que la composición de la gallinaza es bastante compleja y las etapas del BHP solo consiguen disgregar los compuestos y hacerlos solubles (hidrolizarlos) para que posteriormente sean utilizados en la siguiente fase.

En relación a los resultados de Sólidos Totales y Volátiles se observa cómo los datos disminuyen en ambos sustratos. Aun así, una elevada cantidad de ST al final del ensayo podría reflejarse en una menor producción de hidrógeno, como ocurre en la mezcla LVG. Esto se debe a que la concentración de Sólidos Totales indica mayor presencia de materia orgánica y con ello mayor cantidad de carbohidratos que pueden afectar a la producción de dicho gas (Tyagi et al., 2014).

En la *Grafica 4* de AGV puede observarse que en ambas mezclas aumentan las concentraciones finales respecto a las iniciales de todos los ácidos. Este aumento es consecuencia de los procesos de hidrólisis y acidogénesis que tienen lugar en la DA generando ácidos grasos como producto de la degradación de moléculas orgánicas complejas (Silva et al., 2017).

Además, es interesante conocer la composición individual de los ácidos en el medio, ya que existe una relación entre los ácidos grasos y la producción de hidrógeno. Existen estudios relativos a este tema que concretan que la producción de hidrógeno está ligada a la producción de acético (4 mol H₂/ mol glucosa) y butírico (2 mol H₂/ mol de glucosa) (Kayfeci et al., 2019). También se conoce que el ácido propiónico es tóxico para las bacterias, por lo que la presencia de esta sustancia inhibe la producción de hidrógeno (Lovato et al., 2018). Por tanto, interesa que la materia orgánica se transforme mayoritariamente en ácido acético a partir del proceso acidogénico.

5.2.2. Resultados de los test BMP

Los datos de la caracterización fisicoquímica inicial y final de los test BMP con los diferentes sustratos se muestran en la *Tabla 8* y *Grafico 5*.

Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos de los sustratos en BMP.

Parámetros		Control, C _{BMP}	(LV) _{BMP}	(LVG) _{BMP}
pH	Inicial	7.77±0.01	7.21±0.01	7.20±0.00
	Final	7.76±0.02	8.06±0.00	8.05±0.01
DQOt (gO ₂ /L)	Inicial	51.92±0.00	48.88±0.01	53.64±0.00
	Final	20.36±2.35	33.70±0.77	35.14±0.85
DQOs (gO ₂ /L)	Inicial	22.71±0.00	25.53±0.00	26.79±0.01
	Final	9.72±0.04	16.26±1.33	16.20±0.04
ST (g/L)	Inicial	42.64±0.12	37.03±1.33	38.61±0.13
	Final	17.43±0.37	29.76±0.05	31.34±0.06
SV(g/L)	Inicial	32.59±1.31	25.81±0.50	28.05±0.21
	Final	12.18±0.25	19.61±0.02	20.96±0.24

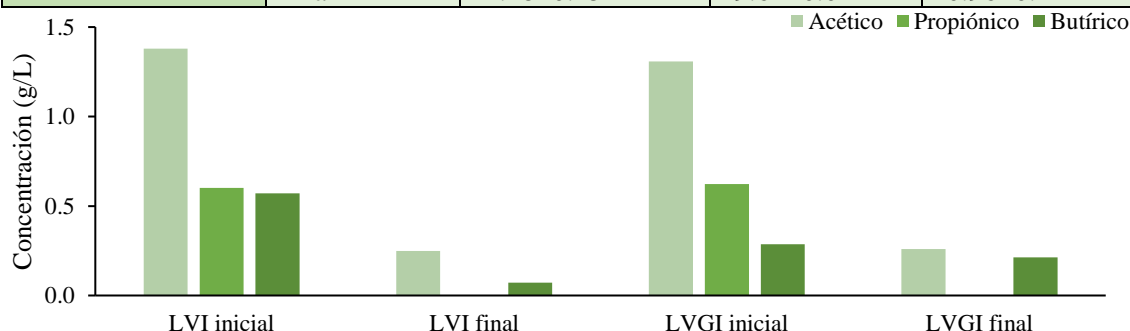


Gráfico 5. Concentración de Ácidos Grasos Volátiles (g/L) de los sustratos para el BMP.

En cuanto a los datos de pH, a pesar de partir de un pH en torno a 7, puede verse cómo durante el desarrollo del ensayo aumenta su valor dado que, como comentamos en el apartado anterior las poblaciones microbianas presentes en los sustratos tienen la capacidad de autorregularse y modificar las condiciones del medio. Así, en este estudio, las *Archaeas* metanogénicas regulan el pH del medio a valores por encima de 7,2.

En relación a los valores de DQO se observa que la materia se degrada, disminuyendo tanto la DQO total como soluble al final del ensayo. Estos datos se analizan en el *apartado 5.2.3. de Rendimiento de los procesos*.

Observando los datos de sólidos totales y volátiles, los iniciales son mayores que los finales, indicativo de que la materia orgánica se ha degradado. Sin embargo, esta disminución de materia particulada y soluble es mayor de la que realmente queda representada. Esto ocurre porque durante el ensayo hay un aumento de las poblaciones de microorganismos, que se reproducen debido a su actividad biológica, y éstos también quedan recogidos analíticamente en la medición de sólidos volátiles.

Respecto a los datos de AGV que se representan en el *Gráfico 5* puede verse que disminuyen al final del ensayo de manera que se observa cómo la materia orgánica (en forma de AGV) es consumida en esta etapa por las *Archaeas* metanogénicas para producir metano. A diferencia de la fase anterior en la que los ácidos aumentaban debido a la actividad de las bacterias acidogénicas, siendo los AGV el producto final de esta etapa.

5.2.3. Rendimiento de los procesos

En las *Tabla 9* y *Tabla 10* se representan los resultados de los cálculos para cada mezcla:

Tabla 9. Porcentaje de eliminación BHP.

Parámetro	(LV) _{BHP}	(LVG) _{BHP}
Eliminación DQOt (%)	11.95	-11.11
Eliminación DQOs (%)	1.85	-18.47
Rendimiento de hidrólisis (%)	98.15	118.47
Eliminación ST (%)	21.37	21.53
Eliminación SV (%)	28.52	22.89

Observando la evolución de los diferentes parámetros del BHP, los valores de eliminación de DQO total y soluble para la mezcla LV son pequeños; incluso negativos para LVG, lo cual indica que no hay consumo de materia orgánica, únicamente hay un cambio físico de la materia orgánica compleja, que pasa de estar particulada o en suspensión a estar

hidrolizada. Debido a ello los rendimientos de hidrólisis son elevados en ambos casos (99% para (LV)_{BHP} y 118% para (LVG)_{BHP}

Tabla 10. Porcentaje de eliminación BMP.

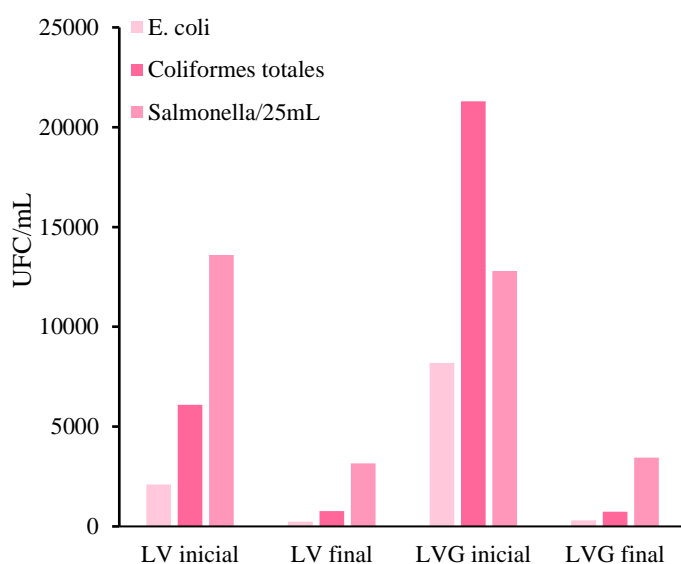
Parámetro	(LV) _{BMP}	(LVG) _{BMP}
Eliminación DQOt (%)	31.05	34.49
Eliminación DQOs (%)	36.29	39.51
Rendimiento de hidrólisis (%)	63.71	60.49
Eliminación ST (%)	19.62	18.83
Eliminación SV (%)	24.01	25.29

Examinando los datos del ensayo BMP se observa que ambos ensayos presentan rendimientos muy similares. Así, los test con ambos sustratos presentan porcentajes de eliminación de DQOt y DQOs del orden de 30-40%. Sin embargo, el rendimiento de hidrólisis se encuentra en torno al 60%, bastante menor que en el ensayo de potencial de hidrógeno, lo cual es coherente con el tipo de proceso microbiológico que se está llevando a cabo.

Comparando ambos estudios puede observarse cómo los porcentajes de biodegradabilidad son mayores en el BMP, lo que concuerda con lo mencionado en el

epígrafe 2.2. de Digestión Anaerobia. En cuanto a la eliminación de Sólidos los valores son bastante similares en los dos ensayos (aproximadamente 20-30%) y no hay diferencias significativas entre las mezclas, en el ensayo BHP se debe a que la degradación de materia orgánica es pequeña y en el ensayo BMP se debe a la presencia de microorganismos en la medición de dicho parámetro.

5.3. Determinación de patógenos



Según la legislación europea (Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019) el valor máximo permitido de patógenos es de 1000UFC/mL para *E. coli* (siendo éste en torno al 90% de coliformes totales) y ausencia UFC/25mL para *Salmonella*.

Gráfico 6. Representación de patógenos para las mezclas iniciales y finales de LV y LVG.

En el *Gráfico 6* se presentan los resultados de *E. coli*, Coliformes totales y *Salmonella*/25mL en las mezclas de LV y LVG al inicio del ensayo BHP y a la salida del ensayo BMP. Como puede observarse todos los valores disminuyen drásticamente al final del proceso. No obstante, las condiciones de operación mesofílicas (a 35 °C) no son capaces de eliminar patógenos de manera eficiente. Así, en ninguno de los estudios se cumplen los requisitos que marca la legislación en cuanto al contenido en *Salmonella*. Sin embargo, sí se consigue eliminar C_T y *E. Coli* en ambos estudios dentro de los rangos permitidos.

Puede observarse que la concentración de patógenos es mayor en la mezcla inicial que contiene gallinaza, esto se debe a la gran cantidad de microorganismos que forman parte de este sustrato como se explica en el *apartado 2.1.3. de Gallinaza*.

5.4. Biogás

5.4.1. Hidrógeno

En el *Gráfico 7* y *8* se muestran las producciones acumuladas de hidrógeno (mL) para cada mezcla y en el potencial de producción de las mismas (mLH₂/gSV).

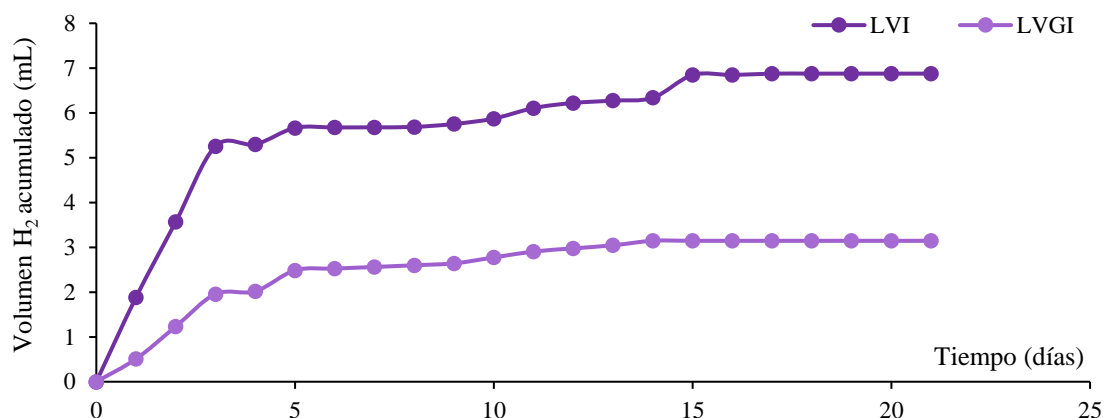


Gráfico 7. Producción acumulada de hidrógeno.

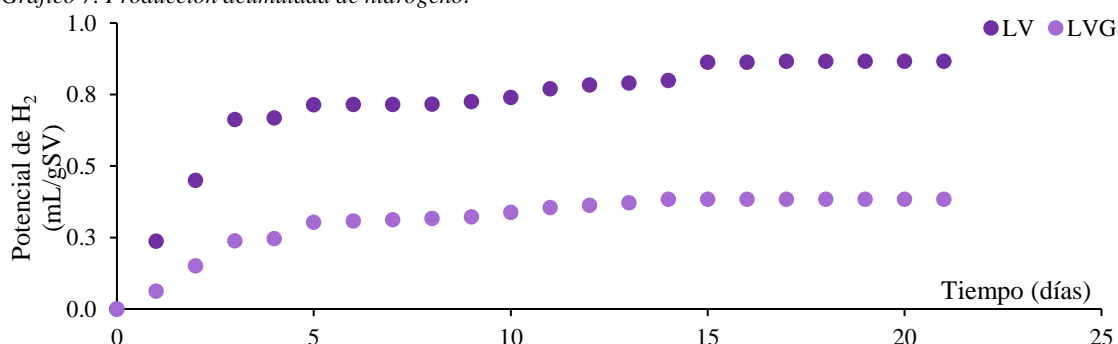


Gráfico 8. Potencial de producción de hidrógeno.

Claramente se observa que la mezcla LV produce más hidrógeno ($6,8 \text{ mLH}_2$) a los 17 días de operación frente a la mezcla LVG ($3,14 \text{ mLH}_2$), además de ser la que tiene mayor potencial producción de este gas ($1,73 \text{ mLH}_2/\text{gSV}$). En general, estos datos son acordes con las caracterizaciones de los sustratos, ya que esta mezcla tenía mayor cantidad de acético y butírico, sustancias que favorecen la generación de hidrógeno en la fase acidogénica.

En el caso de la mezcla LVG no produce apenas hidrógeno debido a que hubo actividad metanogénica no deseada en el medio, y el pH aumentó hasta valores cercanos a 7. Este pH provocó la inhibición de la población acidogénica. Por tanto, a pesar de que la DQO soluble aumenta como consecuencia de la hidrólisis de las moléculas orgánicas complejas (se detecta un alto rendimiento de hidrólisis), la generación de metano indica que hay un cierto consumo de DQO por esta vía y muy poca generación de hidrógeno.

Por tanto, en rango mesofílico de operación, la combinación de sustratos LV es más productiva que la mezcla LVG. Es decir, la adición de gallinaza empeora la productividad de generación de hidrógeno en los ensayos.

Por otro lado, si comparamos con otros estudios abordados con LV en otros rangos de temperatura, podemos decir que el rango mesofílico genera menor cantidad de hidrógeno

que el termofílico. Así, en rango termofílico se alcanzan hasta 140 mLH₂ para mezclas LV en ensayos BHP (Tena et al., 2020), frente a 7 mLH₂ en rango mesofílico. Por tanto, como era de esperar, las temperaturas mesofílicas no mejoran la productividad de hidrógeno en ensayos BHP de potencial de hidrógeno.

5.4.2. Metano

En el *Gráfico 9* y *10* se muestran la producción acumulada (mL) de metano para cada mezcla y en el potencial de producción de las mismas.

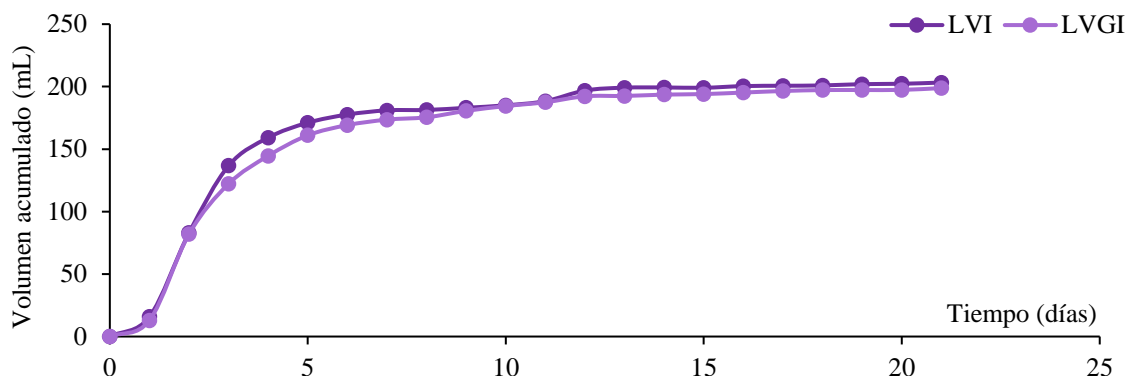


Gráfico 9. Producción acumulada de metano.

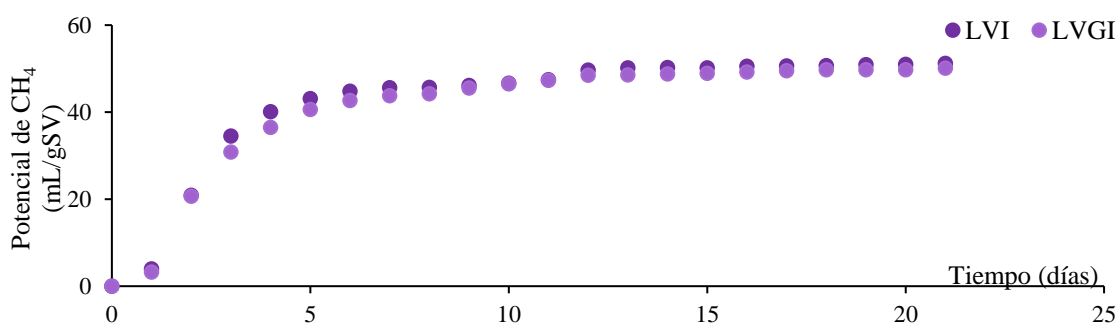


Gráfico 10. Potencial de producción de metano.

En las gráficas que se muestran para el ensayo BMP se observa cómo las dos mezclas producen aproximadamente la misma cantidad de metano (aprox. 200 mL). De la misma forma, el potencial de LV y LVG es parecido, con una producción del 60% en ambos casos. Los datos obtenidos se encuentran entre los valores típicos de producción de metano en rango mesofílico.

En las gráficas se observa cómo las dos mezclas generan aproximadamente la misma cantidad de metano (aprox. 200 mL en 12 días de operación). De la misma forma, el potencial de LV y LVG es casi idéntico, con una producción aproximada de 50 mLH₂/gSV en ambos casos. Estos datos se encuentran entre los valores bibliográficos típicos de producción de metano para mezclas LV en rango mesofílico (Tena et al., 2020).

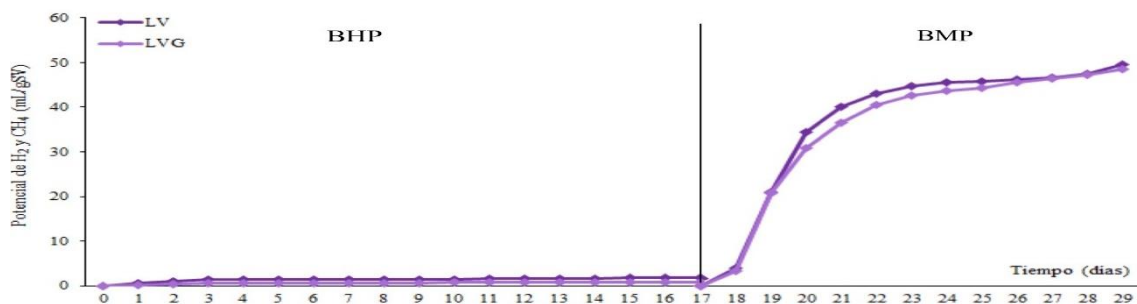


Gráfico 11. Rendimientos del hidrógeno y metano durante los ensayos del proceso en dos etapas de las mezclas.

En el Gráfico 11 se visualiza el potencial de generación de hidrógeno y metano en el tiempo, para ambas mezclas, durante 29 días de operación. Aunque el ensayo BHP dura más tiempo, solo se representa hasta el día 18 dado que a partir de ese día los cambios de volumen de H_2 generado son inferiores al 1%. Asimismo, para el test BMP solo se representan 12 días. Como puede observarse la generación de hidrógeno en el test BHP es muy pequeña frente a la generación de metano en el test BMP, alcanzando valores muy similares para ambas mezcla, del orden de 50 mL CH_4 /gSV tras 29 días de operación.

6. Conclusiones

Una vez se ha finalizado el estudio, las conclusiones obtenidas son las siguientes:

- El rendimiento de la digestión anaerobia acidogénica mesofílica de las mezclas (LV_{BHP} y LVG_{BHP}) medido mediante test BHP no supone una mejora del proceso frente a la operación en rango termofílico (55 °C).
- Los resultados obtenidos durante los ensayos BMP para ambas mezclas, LV y LVG, se encuentran en el rango típico de producción de metano en el rango mesofílico.
- La adición de gallinaza afecta de negativamente a la producción de hidrógeno en las condiciones estudiadas, mientras que para la producción de metano es indiferente.
- El rendimiento total del proceso secuencial BHP - BMP en rango mesofílico es menor que en otros estudios bibliográficos realizados en TPAD termofílico-mesofílico secuencial.
- El proceso TPAD en rango mesofílico no consigue obtener un efluente final con características adecuadas para su utilización en suelos, según los requisitos legales.

Según lo mencionado previamente podemos determinar, como conclusión global que, por un lado, la adición de gallinaza a la mezcla LV no mejora el rendimiento del proceso de co-digestión mesofílica con separación de fases y, por otro, que la temperatura mesofílica es menos eficaz para la generación de hidrógeno y metano que la termofílica, generando un efluente que no cumple los requisitos legales para su utilización como enmienda en el suelo.

7. Bibliografía

- Acosta, Y. L. & Abreu, M. C. O. (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39(1), 35-48.
- Alonso-Estrada, D., Garrido-Carralero, N., Pérez-Ones, O. & Zumalacárregui-de Cárdenas, L. (2015). Alternativas tecnológicas para reducir el efecto ambiental de las vinazas de la industria alcoholera. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 49(2), 44-49.
- Amador-Díaz, A., Veliz-Lorenzo, E. & Bataller-Venta, M. (2015). Tratamiento de lodos, generalidades y aplicaciones. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46, 16-25.
- APHA, AWWA, WPCF. (2012). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed. Washingt. Am. Public Heal. Assoc.
- Chowdhary, P., Raj, A. & Bharagava, R. N. (2018). Environmental pollution and health hazards from distillery wastewater and treatment approaches to combat the environmental threats: A review. *Chemosphere*, 194, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.163>
- Cleves, L. M. C., Orobio, B. A. P., Lozada, P. T. & Vásquez-Franco, C. H. (2016). Perspectivas del ensayo de Potencial Bioquímico de Metano-PBM para el control del proceso de digestión anaerobia de residuos. *Revista Ion*, 29(1).
- Kirk, D. M., & Gould, M. C. (2020). Bioenergy and anaerobic digestion. In *Bioenergy* (pp. 335-360). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815497-7.00017-8>.
- Gonçalves, L. C. (2013). Evaluación de la biodegradabilidad anaerobia de residuos orgánicos pre-tratados térmicamente. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- Edwards, J., Othman, M., Crossin, E. & Burn, S. (2017). Codigestión anaeróbica de residuos de alimentos municipales y lodos de depuradora: una evaluación comparativa del ciclo de vida en el contexto de la prestación de un servicio de residuos. *Tecnología de fuentes biológicas*, 223 , 237-249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.044>.
- Lovato, G., Albanez, R., Stracieri, L., Ruggero, L. S., Ratusznei, S. M., & Rodrigues, J. A. D. (2018). Hydrogen production by co-digesting cheese whey and glycerin in an AnSBBR: Temperature effect. *Biochemical Engineering Journal*, 138, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.007>
- Kayfeci, M. Keçebaş, A. & Bayat, M., (2019). Chapter 3 - Hydrogen production. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814853-2.00003-5>
- Lee, M., Hidaka, T. & Tsuno, H. (2008). Efecto de la temperatura sobre el rendimiento y la diversidad microbiana en un sistema digestor hipertermofílico alimentado con basura de

cocina. Tecnología de fuentes biológicas , 99 (15), 6852-6860.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.038>.

Marin-Batista, J. D., Castro, L., & Escalante, H. (2015). Efecto de la carga orgánica de la gallinaza de jaula en el potencial de biometanización. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 18-23.
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.39971>

Mills, N., Pearce, P., Farrow, J., Thorpe, R. y Kirkby, N. (2014). Evaluación del ciclo de vida ambiental y económico de lodos de depuradora actuales y futuros para tecnologías energéticas. *Gestión de residuos*, 34 , 185-195. doi: 10.1016 / j.wasman.2013.08.024

Ministerio para la transición ecológica (2019). Lodos de depuración de aguas residuales. Retrieved June 9. Recuperado de <https://www.miteco.gob.es/es/calidad-yevaluacion-ambiental/temas/prevencion-y-gestion-residuos/flujos/lodos-depuradora/>

Mohan, S., Vijaya, Y., Murali, P., Chandrasekhara, N., Lalit, V., & Sarma, P. (2007). Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(13), 2286–2295. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.03.015>

Antoniou, N., Monlau, F., Sambusiti, C., Ficara, E., Barakat, A. y Zabaniotou, A. (2019). Contribución a las opciones de economía circular de la gestión mixta de residuos agrícolas: combinación de la digestión anaeróbica con la gasificación para mejorar la recuperación de energía y materiales. *Revista de producción más limpia*, 209 , 505-514.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.055>

Pareja, M. M. E. (2005). Manejo y procesamiento de la gallinaza. *Revista Lasallista de investigación*, 2(1), 43-48.

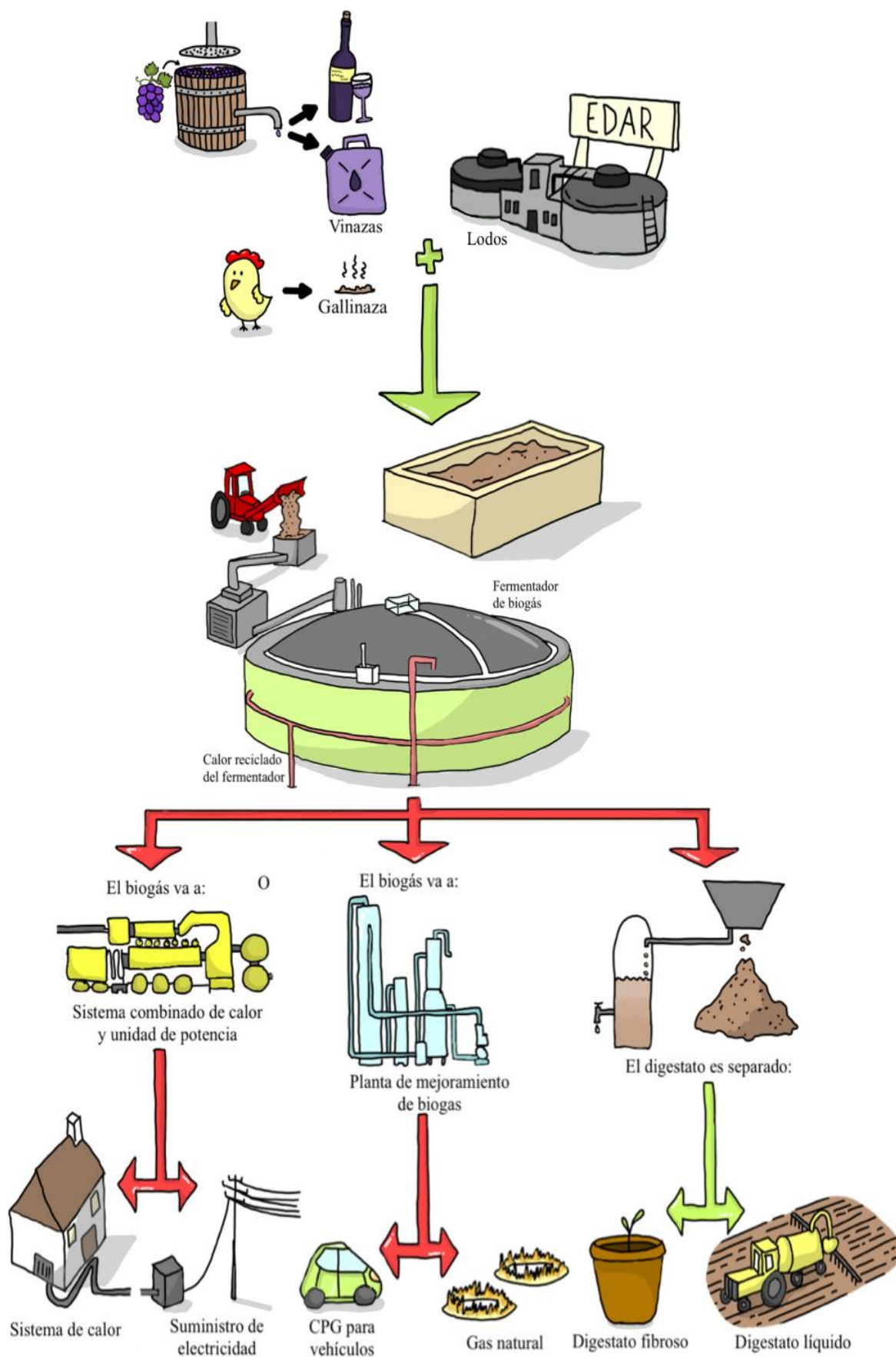
Ramos Marín, S. (2015). Biodegradabilidad anaerobia de fracción orgánica de residuo urbano pretratado mediante esterilización. Recuperado de http://oa.upm.es/48689/1/TFG_SARA_RAMOS_MARIN.pdf

Riau, V.; de la Rubia, M. A.; Pérez, M. (2010). Temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) to obtain class A biosolids: A semicontinuous study. *Bioresource technology*, 101(8), 2706-2712.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.101>

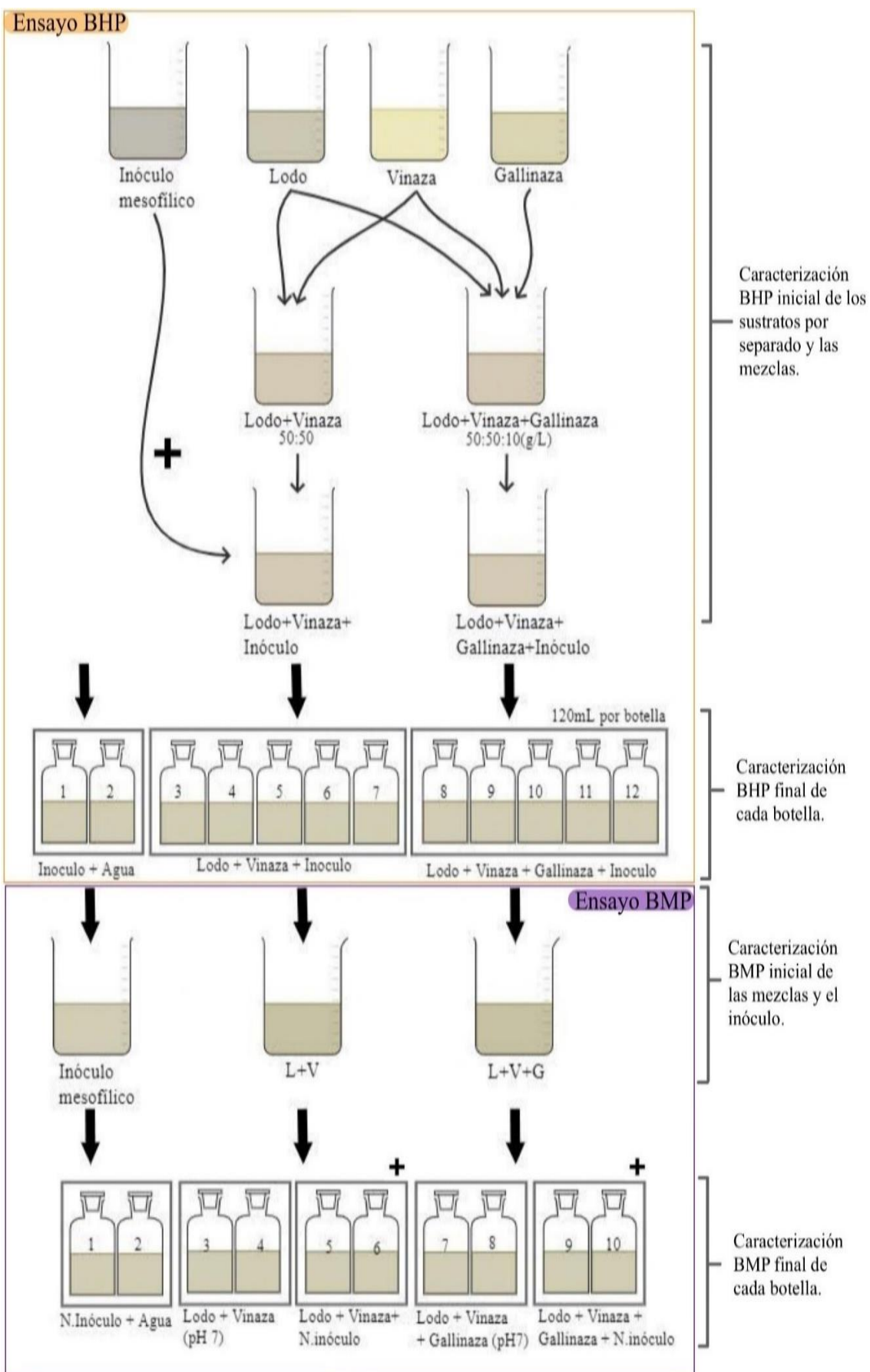
Silva, F. M. S., Mahler, C. F., Oliveira, L. B., & Bassin, J. P. (2018). Hydrogen and methane production in a two-stage anaerobic digestion system by co-digestion of food waste, sewage sludge and glycerol. *Waste Management*, 76, 339–349.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.02.039>

- Silva, F. M., Oliveira, L. B., Mahler, C. F., & Bassin, J. P. (2017). Hydrogen production through anaerobic co-digestion of food waste and crude glycerol at mesophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(36), 22720–22729. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.07.159>
- Solera, R., Muñoz, M. L., Sales, D., & Pérez, M. (2018). Ensayos de biodegradabilidad metanogénica (BMP) de co-digestión anaeróbica de lodos y de lodos pretratados. *Gestión integral de residuos orgánicos. Poniendo en marcha la economía circular en la sociedad – 6ª JORNADAS RED ESPAÑOLA DE COMPOSTAJE 2018* pp. 169-172. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10498/21118>
- Song, Y. C., Kwon, S. J., & Woo, J. H. (2004). Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic- and thermophilic digestion of sewage sludge. *Water Research*, 38(7), 1653–1662. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.12.019>
- Tena, M., Luque, B., Pérez, M., Solera, R. (2020). Enhanced hydrogen production From sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy* 45, 15977-15984. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.075>
- Tyagi, V. K., Angérez Campoy, R., Álvarez-Gallego, C. J., & Romero García, L. I. (2014). Enhancement in hydrogen production by thermophilic anaerobic co-digestion of organic fraction of municipal solid waste and sewage sludge - Optimization of treatment conditions. *Bioresource Technology*, 164, 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.013>
- Kharayat, Y. (2012) Distillery wastewater: bioremediation approaches, *J. Integr. Environ. Sci.* 9. 69–91. <https://doi.org/10.1080/1943815X.2012.688056>.
- Zahedi, S., Solera, R., García-Morales, J.L., Sales, D. (2016). Effect of the addition of glycerol on hydrogen production from industrial municipal solid waste. *Fuel* 2016;180:343–7. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.04.063>.
- Zahedi, S., Martín, C., Solera R., Pérez, M. (2020). Evaluating the effectiveness of adding chicken manure in the anaerobic mesophilic codigestion of sewage sludge and wine distillery wastewater: kinetic modeling and economic approach. *Energy&Fuels*, 34, 12626-12633. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.0c01852>
- Reglamento (UE) 2019/1009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de junio de 2019, por el que se establecen normas sobre la comercialización de productos fertilizantes de la UE y se modifican los Reglamentos (CE) no 1069/2009 y (CE) no 1107 / 2009 y por el que se deroga el Reglamento (CE) no 2003/2003. Recuperado de: <http://data.europa.eu/eli/reg/2019/1009/oj>

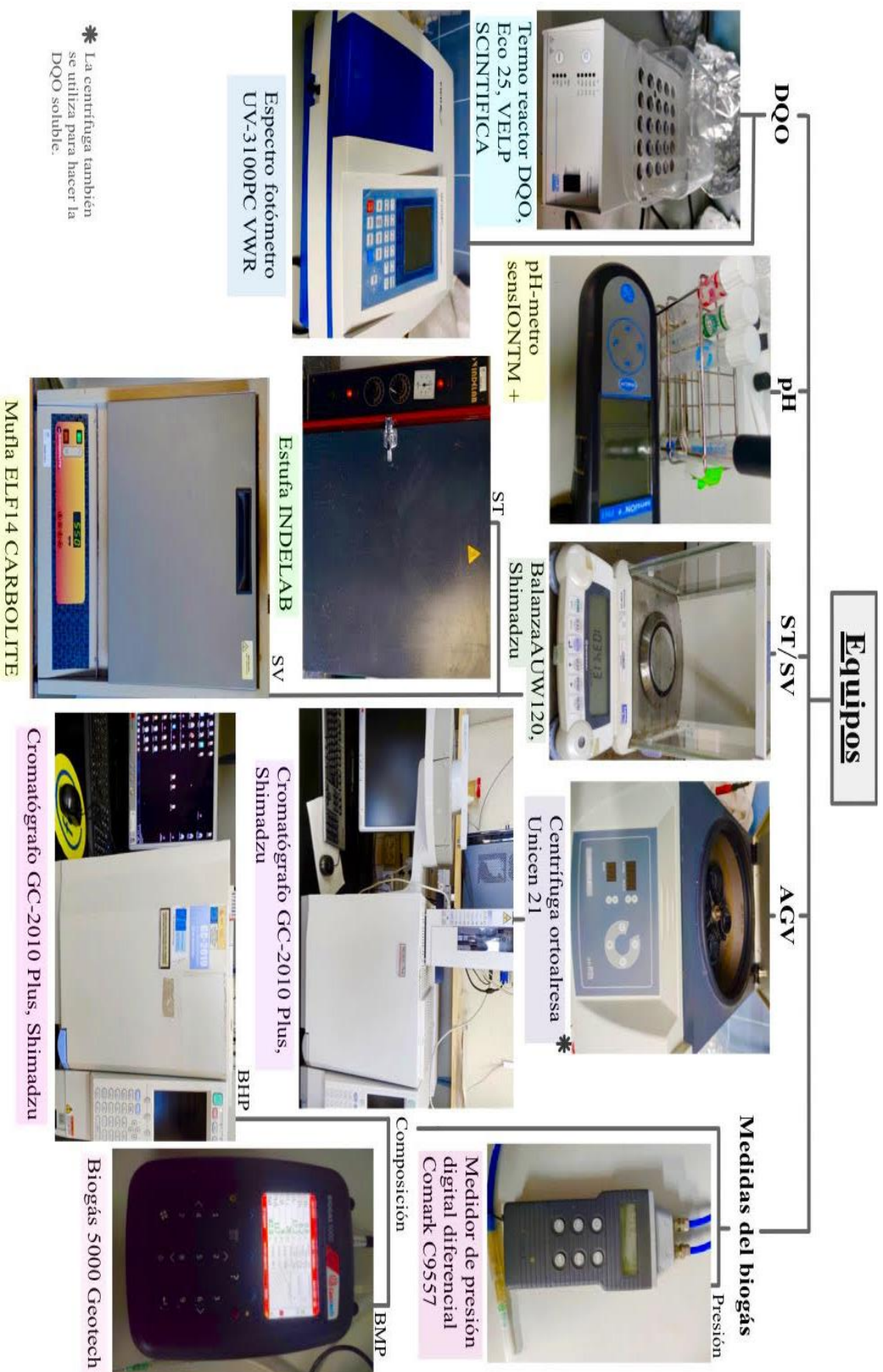
Anexo I – Alternativas de la DA



Anexo II – Plan de trabajo



Anexo III – Equipos



Anexo IV - Acrónimos

AGV: Ácidos Grasos Volátiles

BHP: Potencial Bioquímico de Hidrógeno

BMP: Potencial Bioquímico de Metano

C: control

CodAn: Co-digestión anaerobia

CT: Coliformes totales

DA: Digestión anaerobia

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DQOS: Demanda Química de Oxígeno Soluble

DQOT: Demanda Química de Oxígeno Total

EDAR: estaciones depuradoras de aguas residuales

LV: mezcla Lodo+Vinaza

LVI: mezcla Lodo+Vinaza+Inóculo

LVG: mezcla de Lodo+Vinaza+Gallinaza

LVGI: mezcla de Lodo+Vinaza+Gallinaza+Inóculo

ST: solidos totales

SV: solidos volátiles

TBR: tratamiento biológico de residuos

UFC: Unidades formadoras de colonia

AD: Anaerobic Digestion

BHP: Biochemical Hydrogen Potential

BMP: Biochemical Methane Potential

CHP: Combined Heat and Power

TPAD: Temperature-Phase Anaerobic Digestion